Iranian Food Science and Technology
Research Journal
Homepage: https://ifstrj.um.ac.ir

Research Article
Vol. 20, No. 2, May-June 2024, p. 309-321

Comparison Astaxanthin Extraction of *Fenneropenaeus merguiensis* and *Pontogammarus maeoticus* by Using Organic Solvent, Sunflower Oil and Ionic Liquid Micro Emulsion

P. Feizi[1], Y. Maghsoudlou[2*], H. Shahiri Tabarestani[3], S.M. Jafari[2], A.H. Bahri[4]

1, 2 and 3- Ph.D. Sudent of Food Technology, Professor and Assistant Professor, Department of Food Science & Technology, College of Food Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences & Natural Resources, Gorgan, Iran, respectively.
(*- Corresponding Author Email: y.maghsoudlou@gau.ac.ir)
4- Department of Fisheriese, Marine Technology and Fisheries Science Research Center, Bandar Abbas Branch, Islamic Azad University, Bandar Abbas, Iran

Received: 18.06.2023 Revised: 21.08.2023 Accepted: 28.09.2023 Available Online: 30.09.2023	**How to cite this article:** Feizi, P., Maghsoudlou, Y., Shahiri Tabarestani, H., Jafari, S.M., & Bahri, A.H. (2024). Comparison astaxanthin extraction of *Fenneropenaeus merguiensis* and *Pontogammarus maeoticus* by using organic solvent, sunflower oil and ionic liquid micro emulsion. *Iranian Food Science and Technology Research Journal, 20*(2), 309-321. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/ifstrj.2023.82949.1265

Introduction

Astaxanthin is a widely used carotenoid pigment in the food industry which is extracted from various natural and synthetic sources. Nowadays, due to the adverse effects of organic solvents green solvents which are non-toxic, non-volatile and environmentally friendly have been proposed. Therefore, this study focuses on comparison of the extraction of astaxanthin from shrimp (*Fenneropenaeus merguiensis*) and Gammarus (*Pontogammarus maeoticus*) under soaking conditions for 24 hours with organic solvent (combination of ethanol with ethyl acetate), green solvent (microemulsion of ionic liquid in water) and vegetable oil (sunflower oil). Ionic liquid microemulsion in water is considered a newnovel solvent for astaxanthin extraction. Determination of density, conductivity and diameter were the characteristics of microemulsion test. In extraction,Solvent to sample ratios of 5x, 12.5x and 20x were used for the extraction and compared with the control sample.

Materials and Methods

F. merguiensis and *P. maeoticus* With species approval were procured from Persian Gulf Ecology Research Institute (Iran). Commercial astaxanthin (>98 % purity), α-diphenyl-β-picrylhydrazyl (DPPH), and butylated hydroxytoluene (BHT) were procured from Sigma-Aldrich (USA). The HPLC grade ethanol, propanol, ethyl acetate,, tributyl octyl phosphonium bromide, Triton X-100, and n-butanol were obtained from Merck Chemicals Co. (Germany). Refined sunflower oil which was antioxidant-free, was also purchased from Hayat Company (Iran). The shell of *F. merguiensis* and *P. maeoticus* were carefully washed with distilled water, then freeze-dried (Christ-Alpha 1–4, LD freeze dryer, Germany) for 48 h at -50 °C. After sieving the powders with a laboratory sieve with a mesh smaller than 15 µm. The obtained powders were kept at Refrigerator. All experiments were done in the Food and Drug Administration Department of Hormozgan University of Medical Sciences.

Results and Discussion

According to the results, the density of the microemulsion was determined in the range of 0.97151 g/cm^3, its diameter was 15.8 nanometers and the conductivity was 312 microsiemens at 27.1°C. The results of astaxanthin extraction with different solvents in the comparison with control solvent were statistically significant ($p< 0.05$). According to the results obtained from the extraction of astaxanthin from two sources of shrimp and gammarus, shrimp was selected as the source with the highest amount of extracted astaxanthin. The use of green solvent (ionic liquid

https://doi.org/10.22067/ifstrj.2023.82949.1265

microemulsion in water) in a ratio of 12.5 times solvent to sample was also chosen as the optimal method. The amount of astaxanthin extracted under optimal conditions was 77.44 ± 1.09 mg/ml. The results of DPPH radical inhibition by extracted astaxanthin using ionic, oily and organic solvents compared to synthetic antioxidant BHT showed that the antioxidant activity increased with increasing the concentration of astaxanthin, but this increase was always lower than BHT.

Conclusion

In general, the results of this research show that the use of microemulsion based on ionic liquids is a suitable alternative to conventional methods in extracting and recovering astaxanthin from natural biological sources.

Acknowledgement

We are grateful to the Honorable Vice-Chancellor of Hormozgan Food and Drug Administration for the help in using the Hormozgan Food and Drug Laboratory to conduct the experiments of this doctoral thesis.

Keywords: Astaxanthin, Ionic liquid micro emulsion, *Fenneropenaeus merguiensis*, *Pontogammarus maeoticus*

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
https://ifstrj.um.ac.ir

مقاله پژوهشی
جلد ۲۰، شماره ۲، خرداد-تیر ۱۴۰۳، ص. ۳۲۱-۳۰۹

مقایسه استخراج آستاگزانتین از میگوی موزی (*Fenneropenaeus merguiensis*) و سخت پوست گاماروس (*Pontogammarus maeoticus*) به کمک حلال آلی، روغن آفتابگردان و میکروامولسیون مایع یونی در آب

پریسا فیضی[۱]- یحیی مقصودلو[۲]*- هدی شهیری طبرستانی[۳]- سید مهدی جعفری[۲]- امیر هوشنگ بحری[۴]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۳/۲۸
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۷/۰۶

چکیده

آستاگزانتین رنگدانه‌ی کاروتنوئیدی پرکاربرد در صنایع غذایی است که از منابع مختلف طبیعی و سنتزی به روش‌های گوناگون استخراج می‌شود. امروزه باتوجه به اثرات نامطلوب حلال‌های آلی استفاده از حلال‌های سبز رایج شده است. زیرا این حلال‌ها نسبت به حلال‌های آلی دوستدار محیط‌زیست بوده و ویژگی‌هایی مانند فراریت و سمی بودن را ندارند. بنابراین این پژوهش با هدف استخراج آستاگزانتین تحت شرایط خیساندن به مدت ۲۴ساعت با حلال آلی (مخلوط اتانول: اتیل استات (۱:۲))، حلال سبز (میکروامولسیون مایع یونی در آب) و روغن گیاهی (روغن آفتابگردان) از پوسته میگوی موزی (*Fenneropenaeus merguiensis*) و سخت پوست گاماروس (*Pontogammarus maeoticus*) انجام شد. میکرو امولسیون مایع یونی در آب به‌عنوان حلالی جدید برای استخراج آستاگزانتین در نظر گرفته شد. تعیین چگالی، رسانایی و قطر از جمله ویژگی‌های مورد آزمون میکروامولسیون بودند. بهترین شرایط برای استخراج، بیشترین میزان آستاگزانتین است که با به کارگیری حلال‌ها و نسبت‌های حلال به نمونه ۵ برابر، ۱۲/۵ برابر و ۲۰ برابر تعیین شد. میزان آستاگزانتین، کاروتنوئید کل، درصد بازیافت و فعالیت مهار رادیکال DPPH آزمون‌هایی بودند که برای بررسی آستاگزانتین استخراجی انجام شدند. طبق نتایج چگالی میکروامولسیون در محدوده ۰/۹۷۱۵۱ گرم بر سانتی‌متر مکعب، قطر آن ۱۵/۸ نانومتر و رسانایی ۳۱۲ میکروزیمنس در دمای ۲۷/۱ درجه سانتی‌گراد تعیین شد. نتایج حاصل از استخراج آستاگزانتین با حلال‌های مختلف در مقایسه با حلال اتانول بعنوان شاهد از لحاظ آماری معنی‌دار بود. با توجه به نتایج بدست آمده از استخراج آستاگزانتین از دو منبع میگوی موزی و سخت‌پوست گاماروس، میگوی موزی به‌عنوان منبع با بالاترین میزان آستاگزانتین استخراجی انتخاب شد. استفاده از حلال سبز(میکرو امولسیون مایع یونی در آب) در نسبت ۱۲/۵ برابر حلال به نمونه نیز به‌عنوان بهترین روش انتخاب شد. مقدار آستاگزانتین استخراج شده در بهترین شرایط ۱/۰۹ ± ۷۷/۴۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. نتایج حاصل از مهار رادیکال DPPH توسط آستاگزانتین استخراج شده به کمک حلال‌های ذکر شده در مقایسه با آنتی‌اکسیدان سنتتیک BHT نشان داد که با افزایش غلظت آستاگزانتین فعالیت آنتی‌اکسیدانی افزایش می‌یابد. اما این افزایش همواره کمتر از فعالیت آنتی‌اکسیدانیBHT بود. به‌طور کلی نتایج حاصل ازاین پژوهش نشان داد که استفاده از میکروامولسیون مبتنی برمایع یونی جایگزین مناسبی برای روش‌های مرسوم دراستخراج و بازیابی آستاگزانتین ازمنابع زیستی طبیعی است.

واژه‌های کلیدی: آستاگزانتین، سخت پوست گاماروس، میکرو امولسیون مایع یونی، میگوی موزی

۱، ۲ و ۳- به‌ترتیب دانشجوی دکتری فناوری مواد غذایی، استاد و استادیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
(*- نویسنده مسئول: Email: y.maghsoudlou@gau.ac.ir)
۴- گروه شیلات، مرکز تحقیقات فناوری‌های دریایی و شیلاتی، واحد بندرعباس، دانشگاه آزاد اسلامی، بندرعباس، ایران

https://doi.org/10.22067/ifstrj.2023.82949.1265

مقدمه

رنگ‌ها، یکی از مهم‌ترین افزودنی‌های مواد غذایی می‌باشند که تأثیر بسزایی بر بازارپسندی محصول تولید شده، دارند. به همین دلیل، استفاده از ترکیبات مولد رنگ در صنایع مختلف از جمله صنعت غذا از جایگاه ویژه‌ای برخوردار است.کاروتنوئیدها، یکی از مهم‌ترین رنگ‌های طبیعی، هستند که به‌طور طبیعی در کلروپلاست و یا کروموپلاست گیاهان و برخی از ارگانیسم‌های فتوسنتزکننده مثل جلبک‌ها وجود دارند (Norshazila, Irwandi, Othman, & Zuhanis, 2012). آستاگزانتین[1] کتوکاروتنوئیدی از گروه گزانتوفیل‌ها و یکی از معروف‌ترین رنگدانه‌های کاروتنوئیدی می‌باشد، که درحالت آزاد به رنگ‌های صورتی تا قرمز دیده می‌شود. این کارتنوئید رنگدانه محلول در چربی است و در حلال‌هایی مانند استون، اتانول و کلروفرم حل می‌شود. آستاگزانتین حاوی زنجیره بلند از پیوند دوگانه مزدوج و گروه‌های کتونی می‌باشد. این ویژگی در آستاگزانتین موجب می‌گردد که فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن افزایش یابد و بتواند رادیکال‌های آزاد را به‌سرعت غیر فعال کند. در مقایسه فعالیت آنتی‌اکسیدانی آستاگزانتین با سایر آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی، محققان به این نتیجه رسیدند که آستاگزانتین در خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد مطلوب‌تر از سایر کاروتنوئیدها نظیر بتاکاروتن عمل می‌کند و در جلوگیری از پراکسیداسیون استرهای متیلی اسیدهای چرب اشباع نشده مؤثرتر است (Ambati, Siew Moi, Ravi, & Aswathanarayana, 2014). مطالعات نشان داده است که قدرت آنتی‌اکسیدانی کاروتنوئید آستاگزانتین ۱۰ برابر بیشتر از سایر کاروتنوئیدها (مانند زئاگزانتین، لوتئین، کانتاگزانتین، بتاکاروتن) و ۱۰۰ برابر بیشتر از آلفاتوکوفرول می باشد (Silva, Rodrigues, Silva, & Rodrigues, 2018). آستاگزانتین از منابع مختلف طبیعی و سنتزی به روش‌های گوناگون قابل استخراج است. آستاگزانتین سنتتیک از منابع پتروشیمی تولید می شود که به‌دلیل ارزان‌تر بودن (هر کیلوگرم حدود ۱۰۰۰ دلار) بیش از ۹۵ ٪ از این بازار را به خود اختصاص داده است. اما به‌دلیل مسائل مربوط به ایمنی مواد غذایی (مسمومیت بالقوه در محصول نهایی) و آلودگی، تا به امروز فقط به‌عنوان یک افزودنی برای تغذیه ماهی (برای اهداف رنگدهی) استفاده شده است و برای مصرف مستقیم انسانی در غذاها یا مکمل‌ها تائید نشده است (Pérez-López *et al.*, 2014). آستاگزانتین طبیعی از برخی جلبک‌ها، ماهی قزل‌آلا، پوسته میگو و غیره استحصال می‌شود و قابلیت استفاده در صنایع غذایی (نوشیدنی‌ها، بستنی، دسر، آبنبات و تولیدات گوشتی) علاوه بر مصارف تغذیه حیوانات آبزی و حیوانات خانگی را دارد (Delgado-Vargas & Paredes-Lopez, 2002). تحقیقات مختلف اثرات درمانی و دارویی آستاگزانتین را بررسی و نتایج مثبتی گزارش کرده‌اند. این رنگدانه دارای فعالیت ضد سرطانی است و در پیشگیری از بیماری‌های قلبی و التهابی و بهبود سلامت چشم نیز کارائی دارد. اثرات ضد التهابی و ضد دیابتی آستاگزانتین نیز ثابت شده است (Brandão, Coêlho, Souza, & Silva, 2019). با توجه به خواص مذکور در آستاگزانتین، استخراج آن از منابع طبیعی جهت کاربرد در آبزی‌پروری و صنایع غذایی ضرورت می‌یابد. برای استخراج آستاگزانتین از میگو تحقیقات بسیاری از جمله استخراج به‌وسیله حلال‌های مختلف با کمک فراصوت، تخمیر میکروبی، استخراج با روغن، مایع یونی، خیساندن، سوکسله و فراصوت، سیال فوق بحرانی، فراصوت به روش حلال سبز و روش‌های استخراج آنزیمی، مایکروویو و پالس الکتریکی مورد مطالعه قرار گرفته است (Saini & Keum, 2018). به‌طور کلی، چندین فناوری می‌تواند در فرآیند استخراج کارآمد آستاگزانتین مورد استفاده قرار گیرد. هوشمند و همکاران (Hooshmand, Shabanpour, Moosavi-Nasab, Alishahi, & Golmakani, 2021)، در بررسی بهینه سازی استخراج رنگدانه‌های کاروتنوئیدی از ضایعات خرچنگ آبی (*Portunus pelagicus*) و میگوی ببری سبز (*Penaeus semisulcatus*) به کمک امواج فراصوت و مایکروویو نشان دادند، ضایعات خرچنگ و میگو می‌توانند به‌عنوان ارزان‌ترین مواد اولیه جهت استخراج رنگدانه‌های کاروتنوئیدی و جایگزینی با رنگ‌های مصنوعی استفاده شوند (Hooshmand *et al.*, 2021). مایعات یونی دارای خواص فیزیکوشیمیایی منحصر به فردی مانند فشاربخار ناچیز، غیرقابل اشتعال بودن، پایداری حرارتی بالا و تجدیدپذیری هستند (مشابه مایع یونی مورد استفاده در این تحقیق). ازسوی دیگر، دوزهای پایین مایعات یونی درآزمایشات حیوانی وآزمایشگاهی منجر به آسیب سلولی نشده است. درنتیجه، مایعات یونی جایگزین‌های بالقوه‌ای برای حلال‌های آلی فرار در صنایع غذایی هستند (Martins, Braga, & de Rosso, 2017). با این حال، ویسکوزیته اکثر مایعات یونی بیشتر از حلال‌های آلی است که در نتیجه منجر به کاهش نرخ انتقال جرم می‌شود. میکروامولسیون روشی امیدورکننده است که امکان استخراج انتخابی مولکول‌های زیستی را درصنایع غذایی و شیمیایی فراهم می‌کند (Amiri-Rigi & Abbasi, 2019). از لحاظ تعریف، امولسیون یک سامانه نامتجانس از دو مایع غیرقابل امتزاج است که در چنین سامانه‌ای یکی از مایع‌ها در مایع دیگر به صورت قطره‌هایی با قطر بیش از ۰/۱ میکرون پراکنده می‌شود. در سامانه‌های غذایی این دو مایع اغلب روغن و آب هستند؛ در صورت پراکنده شدن قطرات روغن در فاز آب (به‌عنوان فاز پیوسته) امولسیون از نوع روغن در آب (O/W) تشکیل می‌شود و اگر قطرات آب در روغن پراکنده شوند، امولسیون از نوع آب در روغن

1- Astaxanthin

(W/O) خواهد بود، در حالی‌که میکروامولسیون‌ها نوعی سامانه امولسیونی هستند که برخلاف امولسیون‌ها از لحاظ ترمودینامیکی پایدارند و اندازه فاز پراکنده در آن‌ها حدود ۱۰۰-۱۰ نانومتر است. اصولاً برای تهیه یک سامانه میکروامولسیونی به سه جزء اساسی شامل آب، روغن و سورفاکتانت (معمولاً همراه با یک کوسورفاکتانت) نیاز است؛ با مخلوط کردن نسبت‌های مناسب از این اجزاء، سامانه میکروامولسیون به خودی خود شکل می‌گیرد. درنتیجه، میکروامولسیون‌ها سامانه‌هایی با ظاهری شفاف، با گرانروی کم، و بسیار پایدارند و برخلاف امولسیون‌ها، با مصرف مقدار بسیار کم انرژی یا بدون مصرف انرژی شکل می‌گیرند (Radi & Abbasi, 2013). میکروامولسیون‌ها ویژگی‌های مطلوبی از جمله پایداری کامل، ویسکوزیته کم و ظرفیت انحلال‌پذیری زیاد برای ترکیبات آبدوست و چربی دوست دارند (Amiri-Rigi, Abbasi, & Scanlon, 2016). تا به امروز، میکروامولسیون‌ها برای استخراج پروتئین‌ها، رنگدانه‌ها و عناصرکمیاب استفاده شده‌اند. گائو و همکاران (Gao *et al.*, 2020)، مطالعه‌ای با هدف بازیابی آستاگزانتین ازضایعات میگو و استخراج به کمک فراصوت با استفاده ازمیکروامولسیون‌مایع یونی درآب (متشکل از مایع یونی، آب، تریتون ایکس۱۰۰ و نرمال بوتانل) انجام دادند. نتایج نشان داد که درمقایسه با حلال‌های آلی (اتانول، استون و دی متیل سولفوکسید)، میکروامولسیون مایع یونی در آب به‌دلیل فعل و انفعالات الکترواستاتیک قوی‌تر و برهمکنش‌های پیوند هیدروژنی باعث افزایش قابل توجه استخراج آستاگزانتین شدند. به‌طور کلی میکروامولسیون مبتنی بر مایع یونی جایگزین مناسبی برای روش‌های مرسوم در استخراج و بازیابی آستاگزانتین از منابع زیستی طبیعی است (Gao *et al.*, 2020). این پژوهش با هدف مقایسه استخراج آستاگزانتین تحت شرایط خیساندن به‌مدت ۲۴ ساعت با حلال آلی (ترکیب اتانول با اتیل استات)، حلال سبز (میکروامولسیون مایع یونی تری بوتیل اکتیل فسفونیوم بروماید بعنوان بخش هیدروفوب در آب که فسفونیوم بخش کاتیونی و بروماید بخش آنیونی را تشکیل می‌دهند) و روغن گیاهی (روغن آفتابگردان) از پوسته میگوی موزی (*Fenneropenaeus merguiensis*) و سخت‌پوست گاماروس (*Pontogammarus maeoticus*) انجام گرفت. علاوه بر این استفاده از این منابع برای استخراج آستاگزانتین برای اولین بار مورد مطالعه قرار می‌گیرد و در صورت حصول آستاگزانتین از آن‌ها، به‌عنوان منابع نوین استخراج معرفی می‌گردند. همچنین به دو حلال کم عارضه (روغن آفتابگردان و مایع یونی) برای مصارف غذایی پرداخته می‌شود. ضمن اینکه استفاده از مایع یونی به‌عنوان حلال سبز در سال‌های اخیر مطرح گردیده و استفاده از آنها بصورت میکروامولسیون در جریان فرآیندهای استخراجی کاملا نوآورانه می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد اولیه

میگوی موزی و سخت‌پوست گاماروس با تأیید نوع گونه از پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس تهیه شدند. آستاگزانتین تجاری با خلوص >۹۸٪، DPPH[1] و BHT[2] از شرکت سیگما آلدریچ خریداری شدند. اتانول، پروپانول و اتیل استات با خلوص کروماتوگرافی و تری بوتیل اکتیل فسفونیوم بروماید[3] و تریتون ایکس ۱۰۰ [4] با خلوص >۹۸٪ و نرمال بوتانول با خلوص ۹۹/۹٪ از شرکت سیگما آلدریچ تهیه شدند. روغن آفتابگردان تصفیه شده بدون آنتی‌اکسیدان نیز از شرکت حیات خریداری شد. کلیه آزمایشات در معاونت غذا و داروی دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان انجام گرفت.

آماده‌سازی نمونه‌ها

پوسته میگوی موزی و سخت‌پوست گاماروس با آب مقطر به خوبی شسته شدند و در خشک کن انجمادی (Christ-Alpha–LD freeze dryer ، آلمان)، در ۵۰- درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۸ ساعت خشک و سپس پودر شدند. پودرهای حاصل را با الک آزمایشگاهی دارای مش کوچکتر از ۱۵ میکرومتر الک کرده و در یخچال نگهداری شدند (Gao *et al.*, 2020).

آماده‌سازی حلال

حلال سبز مورد استفاده میکروامولسیون مایع یونی در آب است که با توجه به تشکیل خود به خودی میکروامولسیون و عدم نیاز به صرف انرژی زیاد فقط با هم زدن و به روش زیر تهیه شد (Gao *et al.*, 2020). تری بوتیل اکتیل فسفونیوم بروماید: تریتون ایکس ۱۰۰ – نرمال بوتانول (۳ به ۱): آب، با نسبت جرمی۰/۱۳: ۰/۲۵: ۰/۶۲مخلوط شد. این ترکیبات به‌ترتیب فاز غیر قطبی، سورفاکتانت–کمک سورفاکتانت و فاز قطبی میکروامولسیون را شامل می‌شوند. این حلال در دمای اتاق قابل نگهداری است. برای نمونه شاهد از اتانول استفاده شد.

نحوه استخراج

حلال‌ها در دمای محیط به نسبت‌های ۵ برابر، ۱۲/۵ برابر و ۲۰ برابر (که با بررسی پژوهش‌های پیشین استخراج آستاگزانتین از منابع

1- 2, 2-Diphenyl-1- picrylhydrazyl
2- Butylated hydroxytoluene
3- Tributyloctylphosphonium Bromide
4- Triton X-100

دیگر تعیین گردید) با پودر نمونه‌ها مخلوط شد و به‌مدت ۲۴ ساعت تحت روش خیساندن بدون هم زدن در دمای محیط قرار گرفت. سپس مخلوط حاصله را به‌مدت ۱۰ دقیقه با ۸۵۰۰ دور در دقیقه تحت دمای محیط سانتریفیوژ (سانتریفیوژیخچال‌دار (Eppendorf، آلمان)) کرده، قسمت بالایی نمونه را جدا کرده و قسمت ته‌نشین شده به شیوه قبل مجدداً تحت استخراج قرار گرفت (جهت در نظر گرفتن بقایای احتمالی در قسمت ته‌نشین شده) و پس از سانتریفیوژ، بخش بالایی آن با مقدار قبل ترکیب شده و با فیلتر ۰/۴۵ میکرومتری از جنس تفلون فیلتر شد تا برای آنالیز آماده گردد (Parjikolaei *et al*., 2016).

آزمون‌ها

ارزیابی خواص فیزیکی میکرو امولسیون

برای اندازه‌گیری رسانایی میکروامولسیون از دستگاه هدایت‌سنج inoLab ساخت کشور آلمان استفاده شد. برای اندازه‌گیری چگالی میکرو امولسیون از چگالی‌سنج[1] ۵۰ میکرولیتر ساخت کشور آلمان استفاده شد. قطر میکروامولسیون بادستگاه پراکنش دینامیکی نور[2] (DLS) (Horiba، ژاپن) تعیین شد.

ارزیابی محتوای کل کاروتنوئیدها (آستاگزانتین کل)

محتوای کاروتنوئید کل با استفاده از اندازه‌گیری‌های اسپکتروفتومتری طبق روش گزارش شده توسط هاو و همکاران (Haque, Dutta, Thimmanagari, & Chiang, 2016) تعیین شد. جهت تعیین محتوای کل کاروتنوئیدها، جذب ۴ میلی‌لیتر از محلول‌های استخراج شده توسط اسپکتروفتومتر[3] (دستگاه اسپکتوفتومتر UV-Vis (Shimadzu، ژاپن)) در طول موج ۴۵۰ نانومتر پس از صفر کردن جذب دستگاه برای هر نوع حلال اندازه‌گیری شد و از ضریب خاموشی ویژه آستاگزانتین ۲۱۰۰ استفاده شد. براساس مطالعات پیشین انجام شده در این رابطه، محتوای کاروتنوئید کل در این طول موج، آستاگزانتین کل در نظر گرفته شد. بازده محتوای‌آستاگزانتین کل[4] (TAC) با استفاده از معادله (۱) برآورد شد (Haque *et al*., 2016).

$$TAC = \frac{V \times A \times ۱۰۰}{۲۱ \times W} \quad (۱)$$

V: حجم حلال مورد استفاده (ml)

A:جذب در طول موج ۴۵۰ نانومتر

W: وزن خشک ماده (g)

آنالیز آستاگزانتین با اسپکتروفتومتر

منحنی استاندارد آستاگزانتین با تهیه رقت‌های مختلف آستاگزانتین خالص در غلظت‌های ۰-۱ میکروگرم بر میلی لیتر با استفاده از ۲-پروپانول بعنوان حلال رنگدانه خالص آستاگزانتین رسم گردید. جذب آستاگزانتین عصاره‌ها در طول موج ۴۷۸ نانومتر ($OD_{۴۷۸}$) دستگاه اسپکتروفتومتر UV-VIS اندازه‌گیری شد و با آزمایش الکل حاوی آستاگزانتین، جذب در سه تکرار ثبت شد. میزان آستاگزانتین عصاره‌ها با استفاده از معادله (۲) محاسبه گردید (Khoo *et al*., 2020).

$$C(mg/ml) = \frac{OD_{478}}{1.97} \quad (۲)$$

C: غلظت آستاگزانتین در ۲-پروپانول

DO: جذب در ۴۷۸ نانومتر

$$y = 1.97X \quad (۳)$$

y: میزان جذب در ۴۷۸ نانومتر

X: غلظت بر حسب میلی گرم بر میلی‌لیتر

محاسبه درصد بازیافت آستاگزانتین

برای این منظور عصاره‌ها مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. درصد بازیافت آستاگزانتین با محاسبه درصد آستاگزانتین استخراج شده تحت هر یک از شرایط استخراج از مقدار آستاگزانتین کل نمونه با توجه به معادله (۴) حاصل شد (Ruen-ngam, Shotipruk, & Pavasant, 2010).

$$\text{بازیابی}\% = \frac{\text{عصاره آستاگزانتین}}{\text{آستاگزانتین کل}} \times ۱۰۰ \quad (۴)$$

فعالیت مهاررادیکال ۲،۲-دیفنیل-۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH)

آستاگزانتین‌های استخراج شده را در یخچال نگهداری کرده تا جهت بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی آستاگزانتین مورد استفاده قرار گیرند. محلول اتانولی DPPH در غلظت ۰/۲ میلی‌مولار تهیه شد. ۲ میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف عصاره‌ها (۰/۷۵-۰/۰۵) جهت بررسی روند تغییرات در سه نوع حلال مورد استفاده با ۲ میلی‌لیتر از محلول اتانولی DPPH ترکیب شدند. جذب نمونه‌ها پس از ۳۰ دقیقه نگهداری در دمای محیط و شرایط تاریکی در ۵۱۷ نانومتر و بعد از صفر کردن جذب دستگاه برای هر نمونه از حلال‌ها اندازه‌گیری و فعالیت مهار رادیکال DPPH براساس معادله (۵) محاسبه شد. این آزمون با قابلیت آنتی‌اکسیدانی، آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT بعنوان شاهد در غلظت‌های مشابه مقایسه شد (X. Zhao, Zhang, Fu, Zhu, & Zhang, 2016).

1- Pycnometer
2- Dynamic Light Scattering (DLS)
3- Spectrophotometry
4- total astaxanthin content

$$\%\text{فعالیت مهار رادیکال DPPH} = \left[A0 - (A - \frac{Ab}{A0})\right] \times 100 \quad (۵)$$

A_0: جذب محلول DPPH بدون نمونه

A: جذب نمونه مخلوط با محلول DPPH

A_b: جذب نمونه بدون محلولDPPH

آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از طرح آماری آنالیز واریانس یکطرفه ANOVA در سطح خطای ۰/۰۵ با نرم‌افزار SPSS 26.0 انجام گرفت. نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شد. رسم نمودارها در نرم‌افزار Excel 2010 انجام شد. بهترین شرایط استخراج آستاگزانتین و بهترین منبع برای استخراج بیشترین میزان آستاگزانتین با به کارگیری دو منبع سخت‌پوست گاماروس و میگوی موزی، حلال‌های اتانول به‌عنوان شاهد، مخلوط اتانول: اتیل استات (۱:۲)، حلال روغنی و میکروامولسیون مایع یونی در آب، در نسبت‌های متفاوت حلال به نمونه ۵، ۱۲/۵ و ۲۰ برابر تعیین شد. تمامی آزمون‌ها سه بار انجام شد.

نتایج و بحث

ارزیابی ویژگی‌های فیزیکی میکروامولسیون

تعیین چگالی، رسانایی و قطر از جمله ویژگی‌های مورد آزمون میکروامولسیون در این پژوهش بودند. مطالعه خواص فیزیکی حلال و وابستگی دمایی آن‌ها برای طراحی و عملکرد مناسب فرآیندهای جداسازی مهم است. با این‌حال، خواص فیزیکی میکروامولسیون‌های مبتنی برمایع یونی کمیاب است و در مطالعات قبلی نادیده گرفته شده است. در این مطالعه چگالی میکروامولسیون در محدوده ۰/۹۷۱۵۱ گرم بر سانتی‌متر مکعب، قطر آن‌ها ۱۵/۸ نانومتر و رسانایی آن‌ها ۳۱۲ میکروزیمنس در دمای ۲۷/۱ درجه سانتی‌گراد تعیین شد. گائو و همکاران (Gao *et al*., 2020)، مطالعه‌ای با هدف بازیافت آستاگزانتین از ضایعات میگو با استفاده از میکروامولسیون مایع یونی در آب انجام داده و ویژگی‌های فیزیکی میکروامولسیون را با حلال‌های آلی، مشابه پژوهش حاضر مورد مقایسه قرار دادند که نتایج چگالی در محدوده‌ی دمایی محیط و میزان رسانایی خوب و قابل قبول با مطالعه ما همخوانی داشت. رسانایی بالای میکروامولسیون مایع یونی نسبت حلال‌های آلی به‌دلیل وجود گونه‌های یونی محلول است که به‌صورت آزادانه حضور داشته و توانایی حرکت دارند. از طرف دیگر کوچک بودن اندازه ذرات در میکروامولسیون نشان دهنده ثبات و یکنواختی عالی می‌باشد. هدایت گری الکتریکی بالای میکروامولسیون مایع یونی در آب باعث برهمکنش بهتر حلال با نمونه و استخراج بالاتر رنگدانه می‌شود (Gao *et al*., 2020).

ارزیابی محتوای کل کاروتنوئیدها

نتایج مربوط به محتوای کل کارتنوئید استخراج شده از نمونه‌های میگوی موزی و سخت‌پوست گاماروس با استفاده از حلال‌های متفاوت (اتانول، مخلوط اتانول: اتیل استات (۱:۲)، میکروامولسیون مایع یونی در آب، حلال روغنی) در نسبت‌های مختلف (۵، ۱۲/۵ و ۲۰ برابر) حلال به نمونه در جدول ۱، نشان داده شده است. طبق نتایج بدست آمده از جدول ۱، تفاوت در محتوای کل کاروتنوئید استخراج شده از میگوی موزی و سخت‌پوست گاماروس در نسبت‌های متفاوت حلال به نمونه معنی‌دار بود ($p < ۰/۰۵$). در بین حلال‌های مختلف استفاده شده برای استخراج کاروتنوئید موجود در میگوی موزی و سخت‌پوست گاماروس حلال میکروامولسیون مایع یونی در آب بیشترین مقدار محتوی کل کارتنوئید را نسبت به اتانول و سایر حلال‌ها نشان داد که این افزایش ازلحاظ آماری نیز معنی‌دار بود ($p < ۰/۰۵$). در بین نمونه‌های میگو و سخت‌پوست گاماروس نیز میزان کارتنوئید کل استخراج شده از میگوی موزی بیشتر از سخت‌پوست گاماروس بود. سومیا و همکاران (Sowmya, Ravikumar, Vivek, Rathinaraj, & Sachindra, 2014) در مطالعه خود گزارش دادند، میگو یک منبع مهم برای استخراج کاروتنوئیدها بویژه آستاگزانتین می‌باشد، که با نتایج حاصل از این پژوهش نیز مطابقت دارد. همچنین مقدار کل کارتنوئید استخراج شده در نسبت‌های مختلف حلال به نمونه با افزایش نسبت‌ها روند صعودی یا کاهشی مرتبی را نشان نداد اما در نسبت ۵ برابر حلال به نمونه میزان کاروتنوئید کل استخراج شده در همه حلال‌ها بیشتر از سایر نسبت‌ها بود این اختلاف ازلحاظ آماری نیزمعنی‌دار بود ($p < ۰/۰۵$). همچنین در بین حلال‌های مختلف استفاده شده در این پژوهش، حلال میکروامولسیون مایع یونی در آب بالاترین میزان کارتنوئید استخراج شده را نسبت به سایر حلال‌ها در تمام نسبت‌های حلال به نمونه نشان داد. تاکنون ازحلال‌های آلی مختلفی برای اســتخراج کاروتنوئیدها از منابع مختلف اســتفاده شــده اســت که معمولا پیشــنهاد مناسب‌ترین حلال، بــه‌دلیــل تفــاوت در قطبیــت انواع کــاروتنوئیــدهای مختلف، پیچیدگی ســــاختارماتریکس (بافت) نمونه و ترکیبات موجود درآن، به سادگی امکان‌پذیر نیست. معمولاحلال‌های غیرقطبی مثل هگزان انتخاب خوبی برای استخراج کاروتنوئیدهای غیرقطبی نظیرکاروتن‌ها هســــتند درحالی‌که حلال‌های قطبی مانند اتانول و اســــتون برای کاروتنوئیدهای قطبی نظیر گزانتوفیل‌ها مناسب‌تر هستند (Amorim-Carrilho, Cepeda, Fente, & Regal, 2014). بنابراین علت بالا بودن کارتنوئیدهای استخراج شده بویژه آستاگزانتین توسط حلال میکروامولسیون مایع یونی در آب را می‌توان به انحلال بهتر رنگدانه‌ها و تطابق قطبیت در این حلال نسبت به سایر حلال‌های مورد استفاده در پژوهش نسبت داد.

جدول ۱- محتوای کل کارتنوئیدها (میلی‌لیتر بر گرم) در میگوی موزی و سخت‌پوست گاماروس در نسبت‌های مختلف حلال به نمونه

Table 1- Total content of carotenoids in *Pontogammarus maeoticus* and *Fenneropenaeus merguiensis* in different solvent to sample ratio

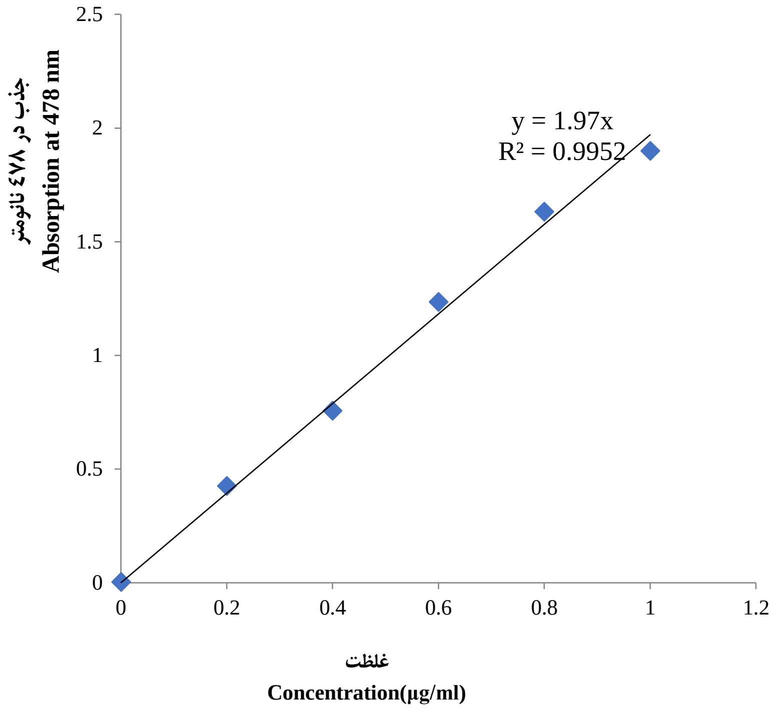
حلال‌ها Solvents	سخت‌پوست گاماروس *Pontogammarus maeoticus* نسبت حلال به نمونه Solvent to sample ratio			میگوی موزی *Fenneropenaeus merguiensis* نسبت حلال به نمونه Solvent to sample ratio		
	5	**12.5**	**20**	**5**	**12.5**	**20**
اتانول Ethanol	45.76± 2.61cA	36.39± 1.58bB	40.39± 2.27cB	44.37±1.48cA	39.80±0.57cB	43.39± 1.56cA
مخلوط اتانول: اتیل استات (۱:۲) (Mixture of ethanol: ethyl acetate (1:2	67.00±1.74bA	39.24±0.03bC	43.69± 0.04bB	81.75±1.18bA	43.28±0.70bC	46.39±1.25bB
میکروامولسیون مایع یونی در آب Ionic liquid microemulsion in water	78.07± 0.67aA	62.17±1.62aC	67.40±1.78aB	88.98±1.33aA	79.58±0.46aB	77.16± 1.08aC
حلال روغنی Oily solvent	48.25± 0.83cA	37.69±1.18bC	40.55± 0.66cB	46.30 ± 0.31cA	42.15±1.77bB	46.78±1.6bA

داده‌ها به صورت میانگین±انحراف معیار (n=3) گزارش شده‌اند. حروف غیرمشابه کوچک در هر ستون نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین حلال‌ها است (p<۰/۰۵). حروف بزرگ در هر ردیف نشان دهنده تفاوت معنی‌داری (p<۰/۰۵) درمیان نسبت‌ها است.

Data are reported as mean ± standard deviation (n=3).Small non-similar letters in each column indicate the existence of a significant difference (p < 0.05) between the solvents.The capital letters in each row indicate a significant difference (p < 0.05) among the ratios.

آنالیز آستاگزانتین با اسپکتروفتومتر

شکل ۱، منحنی استانداردآستاگزانتین با تهیه رقت‌های مختلف آستاگزانتین خالص در غلظت‌های ۰-۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر با استفاده از ۲-پروپانول در طول موج ۴۷۸ نانومتر را نشان می‌دهد. در پژوهش حاضر برای محاسبه منحنی استاندارد از رگرسیون خطی استفاده شد. ضرایب تعیین (R^2) مقدار (۰/۹۹۵۲) خطی بودن مطلوب را در محدوده انتخاب شده برای آستاگزانتین نشان می‌دهد که در شکل ۱نشان داده شده است. نتایج حاصل از استخراج آستاگزانتین با استفاده از حلال‌های مختلف (اتانول، مخلوط اتانول: اتیل‌استات (۱:۲)، حلال میکروامولسیون مایع یونی در آب و حلال روغنی) در نسبت‌های ۵ برابر، ۱۲/۵ و ۲۰ برابر حلال به نمونه در جدول ۲، نشان داده شده است. نتایج بدست آمده نشان داد که میزان استخراج آستاگزانتین از میگوی موزی بالاتر از سخت‌پوست گاماروس است. آنالیز آماری نشان داد که میزان آستاگزانتین استخراج شده با استفاده ازحلال‌های مختلف از میگوی موزی و سخت‌پوست گاماروس در نسبت ۱۲/۵ برابر نسبت به سایر نسبت‌ها بیشترین مقدار است. طبق نتایج حاصل از جدول ۲، در نسبت ۵ برابر میزان استخراج آستاگزانتین از میگوی موزی با استفاده از حلال روغنی کمترین مقدار بود اما در سایر نسبت‌ها حلال اتانول کمترین مقدار استخراج آستاگزانتین را نشان داد. در سخت‌پوست گاماروس نیز در تمام نسبت‌ها همواره میزان استخراج آستاگزانتین با استفاده از حلال اتانول کمترین مقدار را نشان داد، این نتایج از لحاظ آماری نیزمعنی دار بود ($p < ۰/۰۵$). علاوه بر این در بین حلال‌های متفاوت (اتانول، مخلوط اتانول: اتیل استات (۱:۲)، میکروامولسیون مایع یونی در آب و حلال روغنی) هم در میگوی موزی و هم در سخت‌پوست گاماروس حلال میکروامولسیون مایع یونی در آب بیشترین مقدار آستاگزانتین استخراج شده را در همه‌ی نسبت‌ها نشان داد. به‌طور کلی در بین دو نمونه میگوی موزی و سخت‌پوست گاماروس در نسبت‌های متفاوت حلال‌ها، نمونه میگوی موزی در نسبت ۱۲/۵ برابر حلال میکروامولسیون مایع یونی در آب بیشترین میزان استخراج آستاگزانتین را نشان داد. در نسبت‌های بالاتر حلال به نمونه بدلیل محدود بودن ظرفیت انحلال حلال روند کاهشی را نشان داد. بنابراین حلال میکروامولسیون مایع یونی در آب به‌عنوان حلال مناسب، نسبت ۱۲/۵ برابر حلال به نمونه به‌عنوان نسبت مناسب و میگوی موزی به‌عنوان نمونه مناسب انتخاب شدند. در مطالعه تان و همکاران (Tan *et al.*, 2021)، از روش‌های مختلف نظیر میکروفلودیزیشن، فشار بالا، مایعات یونی، آنزیمی و حلال اسیدکلریدریک جهت استخراج آستاگزانتین استفاده شد. نتایج نشان داد که بیشترین راندمان استخراج آستاگزانتین مربوط به روش استخراج با اسیدکلریدریک و مایعات یونی است که با تحقیق حاضر همخوانی دارد (Tan *et al.*, 2021).



شکل ۱- منحنی استاندارد آستاگزانتین درغلظت‌های ۰-۱ میکروگرم برمیلی‌لیتر با استفاده از ۲-پروپانول

Fig. 1. Standard curve of astaxanthin in concentrations of 0-1 µg/ml using 2-propanol

جدول ۲- آستاگزانتین (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) استخراج شده از میگوی موزی و سخت‌پوست گاماروس در نسبت‌های مختلف حلال به نمونه

Table 2- Astaxanthin extracted from *Pontogammarus maeoticus* and *Fenneropenaeus merguiensis* in different solvent to sample ratio

حلال‌ها **Solvents**	سخت‌پوست گاماروس ***Pontogammarus maeoticus*** نسبت حلال به نمونه **Solvent to sample ratio**			میگوی موزی ***Fenneropenaeus merguiensis*** نسبت حلال به نمونه **Solvent to sample ratio**		
	5	**12.5**	**20**	**5**	**12.5**	**20**
اتانول Ethanol	21.47 ± 2.32^{bC}	34.10 ± 1.26^{dA}	30.16 ± 1.17^{dB}	27.20 ± 1.18^{cC}	37.60 ± 1.49^{cA}	32.21 ± 0.97^{dB}
مخلوط اتانول: اتیل استات (۱:۲) (Mixture of ethanol: ethyl acetate (1:2	35.53 ± 0.83^{aB}	38.27 ± 0.61^{cA}	34.59 ± 1.13^{cB}	38.46 ± 1.03^{bC}	52.47 ± 0.53^{bA}	40.87 ± 0.73^{bB}
میکروامولسیون مایع یونی در آب Ionic liquid microemulsion in water	36.39 ± 1.35^{aC}	62.91 ± 0.48^{aA}	59.17 ± 0.20^{aB}	54.22 ± 0.91^{aC}	77.44 ± 1.09^{aA}	72.65 ± 0.67^{aB}
حلال روغنی Oily solvent	34.67 ± 0.74^{aC}	43.24 ± 0.90^{bA}	38.35 ± 0.44^{bB}	23.38 ± 0.89^{dC}	38.24 ± 0.97^{cA}	34.58 ± 0.47^{cB}

داده‌ها به‌صورت میانگین±انحراف معیار (n=3) گزارش شده‌اند. حروف غیرمشابه کوچک در هر ستون نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین حلال‌ها است (p<۰/۰۵). حروف بزرگ در هر ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌داری (p<۰/۰۵) درمیان نسبت‌ها است.

Data are reported as mean ± standard deviation (n=3). Small non-similar letters in each column indicate the existence of a significant difference (p < 0.05) between the solvents. The capital letters in each row indicate a significant difference (p < 0.05) among the ratios.

گائو و همکاران (Gao *et al.*, 2020)، مطالعه‌ای با هدف بازیابی آستاگزانتین از ضایعات میگو (*Penaeus vannamei*) و استخراج به کمک فراصوت بااستفاده از میکروامولسیون مایع یونی در آب انجام دادند. نتایج نشان داد که در مقایسه با حلال‌های آلی (اتانول، استون، و دی متیل سولفوکسید)، میکروامولسیون مایع یونی در آب به‌دلیل فعل و انفعالات الکترواستاتیک قوی‌تر و برهمکنش‌های پیوند هیدروژنی باعث افزایش قابل توجه استخراج آستاگزانتین شدند (Gao *et al.*, 2020). که با نتایج حاصل از پژوهش حاضر نیز مطابقت دارد. به‌طور

کلی میکروامولسیون مبتنی بر مایع یونی جایگزین مناسبی برای روش‌های مرسوم در استخراج و بازیابی آستاگزانتین از منابع زیستی طبیعی است. روهی‌نژاد و همکاران (Roohinejad, Oey, Everett, & Niven, 2014)، استخراج بتاکاروتن از تفاله هویج تیمار شده با میدان الکتریکی پالسی با استفاده از میکروامولسیون روغن در آب را مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که میزان استخراج بتاکاروتن با استفاده از میکروامولسیون آب در روغن مونوکاپریلوکاپرات گلیسرول[۱] در مقایسه با هگزان۱۰۰ درصد بیشتر بود (Roohinejad *et al.*, 2014). این نتایج با نتایج پژوهش حاضر نیز مشابهت دارد. هوشمند و همکاران (Hooshmand *et al.*, 2017) بهینه‌سازی استخراج کاروتنوئیدها ازضایعات سخت‌پوستان از طریق استخراج با حلال آلی و روغن گیاهی را مورد مطالعه قرار دادند. نتایج نشان داد در بین حلال‌ها، استون و روغن آفتابگردان بیشترین میزان عملکرد برای استخراج کاروتنوئید را داشتند. این مطالعه نشان داد که استخراج کاروتنوئیدها به روش حلال آلی کارآمدتر از روش روغن گیاهی است و میزان بازده کاروتنوئید در ضایعات میگو بیشتر از ضایعات خرچنگ است (Hooshmand *et al.*, 2017). نتایج حاصل از این مطالعه نیز با پژوهش حاضر مطابقت دارد.

درصد بازیافت آستاگزانتین

درصد بازیافت آستاگزانتین با محاسبه درصد آستاگزانتین استخراج شده تحت هر یک از شرایط استخراج از مقدار آستاگزانتین کل نمونه (TAC) با توجه به معادله ۴، بدست آمد و نتایج حاصل از درصد بازیافت آستاگزانتین از نمونه‌های میگوی موزی و سخت‌پوست گاماروس با استفاده از حلال های مختلف در نسبت‌های ۵، ۱۲/۵ و ۲۰ برابرحلال به نمونه در جدول ۳ نشان داده شده است. نتایج حاصل نشان داد که درصد بازیافت آستاگزانتین از نمونه میگوی موزی با استفاده از حلال میکروامولسیون مایع یونی در آب در نسبت ۱۲/۵ برابر حلال به نمونه بیشترین مقدار است. از لحاظ آماری نیز این یافته‌ها معنی‌دار بود ($p < ۰/۰۵$). به‌طور کلی تحت شرایط این آزمایش هر چه میزان استخراج آستاگزانتین بیشتر باشد درصد بازیافت استاگزانتین نیز بیشتر خواهد بود این نتایج با نتایج حاصل از آنالیز استاگزانتین با اسپکتروفتومتر در پژوهش حاضر نیز مطابقت دارد.

فعالیت مهاررادیکال ۲،۲-دیفنیل-۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH)

بررسی فعالیت به دام اندازی رادیکال آزاد DPPH یکی از روش های تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. در این روش رنگ ارغوانی رادیکال‌های آزاد DPPH در اثر آنتی‌اکسیدان‌های موجود در عصاره خنثی شده و بی‌رنگ می‌گردد. لذا درجهٔ بی‌رنگ شدن این ترکیب بیانگر قدرت به دام اندازی رادیکال آزاد توسط آنتی‌اکسیدان‌های موجود می‌باشد (Nikmaram, Mousavi, Emam-Djomeh, Kiani, & Razavi, 2015). نتایج حاصل ازمهار رادیکال DPPH توسط غلظت‌های متفاوت آستاگزانتین استخراج شده با حلال اتانول، مخلوط اتانول: اتیل استات (۱:۲)، حلال روغنی و حلال میکروامولسیون مایع یونی در آب در شکل ۲، نشان داده شده است. با افزایش غلظت، میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی آستاگزانتین استخراج شده توسط حلال‌های مختلف افزایش یافت. در بین حلال‌های استفاده شده برای استخراج آستاگزانتین، آستاگزانتین استخراج شده توسط حلال روغنی فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری نسبت به حلال مایع یونی و مخلوط اتانول: اتیل استات (۱:۲) نشان داد. اگر چه رنگدانه استخراج شده توسط حلال روغنی فعالیت آنتی‌اکسیدانی نزدیک به BHT داشت، اما همواره میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی BHT نسبت به این رنگدانه بالاتر بود. به‌طور کلی افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی آستاگزانتین استخراج شده توسط حلال روغنی عاری از آنتی‌اکسیدان نسبت به سایر حلال‌ها را می‌توان به حفاظت بهتر رنگدانه در روغن آفتابگردان نسبت داد. بعلاوه رنگدانه آستاگزانتین به سبب داشتن ماهیت چربی دوست در حلال روغن تمرکز بهتری داشته و از تماس با اکسیژن محیط دور مانده و خواص آنتی اکسیدانی خود را بیشتر حفظ می‌کند. در حلال مایع یونی علی‌رغم داشتن بالاترین میزان از رنگدانه بدلیل اکسید شدن جزئی یا آسیب‌های احتمالی بعدی طی دوره نگهداری خواص آنتی‌اکسیدانی کمتری نسبت به حلال روغن دارد. با توجه به نتایج این پژوهش می‌توان دریافت که بسته به نوع حلال مورد استفاده برای استخراج آستاگزانتین فعالیت آنتی اکسیدانی نیز متفاوت خواهد بود. فعالیت آنتی‌اکسیدانی آستاگزانتین در بسیاری از تحقیقات بیان شده است. آستاگزانتین به‌دلیل ساختمان مولکولی‌اش، خواص شیمیایی بسیار خاصی داشته و نقش مهمی در حذف رادیکال‌های آزاد و فلزات سنگین دارد. حضور قسمت‌های کتو بر روی حلقه یونی مسئول خواص آنتی‌اکسیدانی بالا این ترکیب می‌باشد. آستاگزانتین، هم در قسمت زنجیره کنژوگه غیر اشباع (پلی-انی) و هم در قسمت حلقه‌های ترمینال (حلقه‌های C3) رادیکال‌های آزاد را به دام می‌اندازد (Kishimoto *et al.*, 2010).

1- glycerol monocaprylocaprate oil

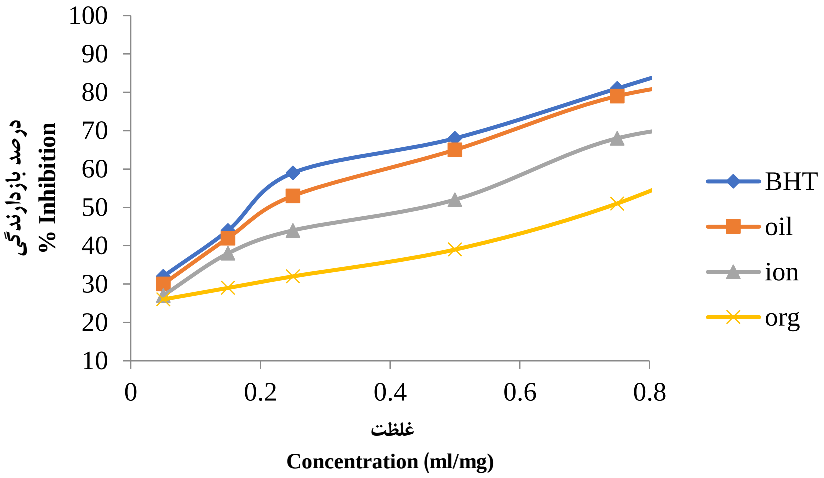
جدول ۳- درصد بازیافت آستاگزانتین از میگوی موزی و سخت‌پوست گاماروس در نسبت‌های مختلف حلال به نمونه

Table 3- Astaxanthin recovery percentage from *Pontogammarus maeoticus* and *Fenneropenaeus merguiensis* in different solvent to sample ratio

حلال‌ها Solvents	سخت پوست گاماروس *Pontogammarus maeoticus* نسبت حلال به نمونه Solvent to sample ratio			میگوی موزی *Fenneropenaeus merguiensis* نسبت حلال به نمونه Solvent to sample ratio		
	5	12.5	20	5	12.5	20
اتانول Ethanol	58.33±1.21[aC]	91.33±1.38[aA]	74.33±1.52[dB]	56.00±1.00[cC]	88.66±1.52[cA]	76.66±0.57[dB]
مخلوط اتانول: اتیل استات (۱:۲) (Mixture of ethanol: ethyl acetate (1:2	50.00±1.00[bC]	96.66±1.52[aA]	82.00±1.00[bB]	62.33±0.57[aC]	91.33±1.15[bA]	85.66±0.57[bB]
میکروامولسیون مایع یونی در آب Ionic liquid microemulsion in water Green solvent	46.00±1.00[cC]	97.00±1.00[aA]	87.33±0.57[aB]	59.33±0.57[bC]	97.66±0.57[aA]	92.66±0.57[aB]
حلال روغنی Oily solvent	56.00±1.00[aC]	94.00±1.00[aA]	78.33±0.57[cB]	55.00±1.00[cC]	89.33± 0.57 [cA]	79.00±1.00[cB]

داده‌ها به صورت میانگین±انحراف معیار (n=3) گزارش شده‌اند. حروف غیرمشابه کوچک در هر ستون نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین حلال‌ها است (p<۰/۰۵). حروف بزرگ در هر ردیف نشان دهنده تفاوت معنی‌داری (p<۰/۰۵) درمیان نسبت‌ها است.

Data are reported as mean ± standard deviation (n=3).Small non-similar letters in each column indicate the existence of a significant difference ($p < 0.05$) between the solvents.The capital letters in each row indicate a significant difference ($p < 0.05$) among the ratios.



شکل ۲- فعالیت مهار رادیکال DPPH آستاگزانتین استخراج شده با حلال آلی، یونی و روغنی در مقایسه با BHT

Fig. 2. DPPH radical scavenging activity of astaxanthin extracted with organic, ionic and oily solvent compared to BHT

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که چگالی میکروامولسیون‌مایع یونی در آب در محدوده ۰/۹۷۱۵۱ گرم بر سانتی‌متر مکعب، قطر آن ۱۵/۸ نانومتر و رسانایی ۳۱۲ میکروزیمنس در دمای ۲۷/۱ درجه سانتی‌گراد بود. با توجه به نتایج بدست آمده از استخراج آستاگزانتین از دو منبع میگوی موزی و سخت‌پوست گاماروس، میگوی موزی به‌عنوان منبع با بالاترین میزان آستاگزانتین استخراجی انتخاب شد. حلال سبز (میکرو امولسیون مایع یونی در آب) در نسبت ۱۲/۵ برابر حلال به نمونه به عنوان روش مناسب برای استخراج انتخاب شد. مقدار آستاگزانتین استخراج شده در بهترین شرایط ۱/۰۹ ± ۷۷/۴۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود، که نشان‌دهنده انحلال بالای رنگدانه در میکروامولسیون مایع یونی است. همچنین نتایج حاصل از مهار رادیکال DPPH یا فعالیت آنتی اکسیدانی آستاگزانتین استخراج شده توسط حلال‌های مورد استفاده در این آزمون در مقایسه با آنتی‌اکسیدان سنتتیک BHT نشان داد که با افزایش غلظت آستاگزانتین فعالیت آنتی‌اکسیدانی افزایش می‌یابد اما این افزایش همواره کمتر از BHT بود. از طرف دیگر در بین

آستاگزانتین استخراج شده توسط حلال‌های ذکر شده آستاگزانتین استخراجی توسط حلال روغنی بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را داشت که علت آن را می‌توان به حفاظت بهتر رنگدانه در روغن آفتابگردان نسبت داد.

سپاسگزاری

از معاونت محترم غذا و داروی هرمزگان که ما را در انجام این پژوهش رساله‌ی دکتری یاری دادند کمال تشکر را داریم.

References

1. Ambati, R.R., Siew Moi, P., Ravi, S., & Aswathanarayana, R.G. (2014). Astaxanthin: Sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications-A review. *Marine drugs, 12*(1), 128-152 . https://doi.org/10.3390/md12010128
2. Amiri-Rigi, A., & Abbasi, S. (2019). Extraction of lycopene using a lecithin-based olive oil microemulsion. *Food chemistry, 272*, 568-573. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.08.080
3. Amiri-Rigi, A., Abbasi, S., & Scanlon, M.G. (2016). Enhanced lycopene extraction from tomato industrial waste using microemulsion technique: Optimization of enzymatic and ultrasound pre-treatments. *Innovative Food Science & Emerging Technologies, 35*, 160-167. https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.05.004
4. Amorim-Carrilho, K., Cepeda, A., Fente, C., & Regal, P. (2014). Review of methods for analysis of carotenoids. *TrAC Trends in Analytical Chemistry, 56*, 49-73. https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.12.011
5. Brandão, L.B., Coêlho, D.F., Souza, R.R., & Silva, C.F. (2019). Technological prospection of astaxanthin recovery of shrimp waste litopenaeus vannamei by the vegetable oil extracton process. *Revista INGI-Indicação Geográfica e Inovação, 3*(465-475).
6. Delgado-Vargas, F., & Paredes-Lopez, O. (2002). *Natural colorants for food and nutraceutical uses*: CRC press.
7. Gao, J., You, J., Kang, J., Nie, F., Ji, H., & Liu, S. (2020). Recovery of astaxanthin from shrimp (*Penaeus vannamei*) waste by ultrasonic-assisted extraction using ionic liquid-in-water microemulsions. *Food Chemistry, 325*, 126850. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126850
8. Haque, F., Dutta, A., Thimmanagari, M., & Chiang, Y.W. (2016). Intensified green production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Food and BioproductsProcessing, 99*, 1-11. https://doi.org/10.1016/j.fbp.2016.03.002
9. Hooshmand, H., Shabanpour, B., Moosavi-Nasab, M., Alishahi, A., & Golmakani, M.T. (2021). The optimization of extraction of carotenoids pigments from blue crab (*Portunus pelagicus*) and shrimp (*Penaeus semisulcatus*) wastes using ultrasound and microwave. *Journal of Marine Science and Technology, 20*(2), 72-93. https://doi.org/10.22113/jmst.2018.105737.2084
10. Hooshmand, H., Shabanpour, B., Moosavi-Nasab, M., & Golmakani, M.T. (2017). Optimization of carotenoids extraction from blue crab (*Portunus pelagicus*) and shrimp (*Penaeus semisulcatus*) wastes using organic solvents and vegetable oils. *Journal of Food Processing and Preservation, 41*(5), e13171. https://doi.org/10.1111/jfpp.13171
11. Khoo, K.S., Chew, K.W., Yew, G.Y., Manickam, S., Ooi, C.W., & Show, P.L. (2020). Integrated ultrasound-assisted liquid biphasicflotation for efficient extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Ultrasonics Sonochemistry, 67*, 105052. https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105052
12. Kishimoto, Y., Tani, M., Uto-Kondo, H., Iizuka, M., Saita, E., Sone, H., & Kondo, K. (2010). Astaxanthin suppresses scavenger receptor expression and matrix metalloproteinase activity in macrophages. *European Journal of Nutrition, 49*(2), 119-126. https://doi.org/10.1007/s00394-009-0056-4
13. Martins, P.L.G., Braga, A.R., & de Rosso, V.V. (2017). Can ionic liquid solvents be applied in the foodindustry? *Trends in Food Science & Technology, 66*, 117-124. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.06.002
14. Nikmaram, P., Mousavi, S.M., Emam-Djomeh, Z., Kiani, H., & Razavi, S.H. (2015). Evaluation and prediction of metabolite production, antioxidant activities, and survival of *Lactobacillus casei* 431 in a pomegranate juice supplemented yogurt drink using support vector regression. *Food Science and Biotechnology, 24*(6), 2105-2112. https://doi.org/10.1007/s10068-015-0279-5
15. Norshazila, S., Irwandi, J., Othman, R., & Zuhanis, H.Y. (2012). Scheme of obtaining [Beta]-carotene standard from pumpkin (*Cucurbita moschata*) flesh. *International Food Research Journal, 19*(2), 531.
16. Parjikolaei, B.R., Errico, M., El-Houri, R.B., Christensen, K.V., & Fretté, X.C. (2016). Green approaches to extract Astaxanthin from Shrimp waste: process design and economic evaluation. In *Computer Aided Chemical Engineering, 38*, 649-654. https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63428-3.50113-2
17. Pérez-López, P., González-García, S., Jeffryes, C., Agathos, S.N., McHugh, E., Walsh, D., Moreira, M.T. (2014). Life cycle assessment of the production of the red antioxidant carotenoid astaxanthin by microalgae: from lab to pilot scale. *Journal of Cleaner Production, 64*, 332-344. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2013.07.011
18. Radi, M., & Abbasi, S. (2013). Microemulsions and their application in food industry, Nano Technology Monthly, No. 3.

19. Roohinejad, S., Oey, I., Everett, D., & Niven, B. (2014). Evaluating the effectiveness of β-carotene extraction from pulsed electric field-treated carrot pomace using oil-in-water microemulsion. *Food and Bioprocess Technology*, *7*, 3336-334. https://doi.org/10.1007/s11947-014-1334-6
20. Ruen-ngam, D., Shotipruk, A., & Pavasant, P. (2010). Comparison of extraction methods for recovery of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Separation Science and Technology*, *46*(1), 64-70. https://doi.org/10.1080/01496395.2010.493546
21. Saini, R.K., & Keum, Y.-S. (2018). Carotenoid extraction methods: A review of recent developments. *Food Chemistry*, *240*, 90-103. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.099
22. Silva, A.K.N.D., Rodrigues, B.D., Silva, L.H.M.D., & Rodrigues, A.M.D.C. (2018). Drying and extraction of astaxanthin from pink shrimp waste (*Farfantepenaeus subtilis*): the applicability of spouted beds. *Food Science and Technology*, *38*, 454-461 .
23. Sowmya, R., Ravikumar, T., Vivek, R., Rathinaraj, K., & Sachindra, N. (2014). Optimization of enzymatic hydrolysis of shrimp waste for recovery of antioxidant activity rich protein isolate. *Journal of Food Science and Technology*, *51*, 3199-3207 . https://doi.org/10.1007/s13197-012-0815-8
24. Tan, Y., Ye, Z., Wang, M., Manzoor, M.F., Aadil, R.M., Tan, X., & Liu, Z. (2021). Comparison of different methods for extracting the astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*: Chemical composition and biological activity. *Molecules*, *26*(12), 3569. https://doi.org/10.3390/molecules26123569
25. Zhao, X., Zhang, X., Fu, L., Zhu, H., & Zhang, B. (2016). Effect of extraction and drying methods on antioxidant activity of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Food and Bioproducts Processing*, *99*, 197-203. https://doi.org/10.1016/j.fbp.2016.05.007